

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.35.004

新生儿大鼠反复惊厥后 8-OH-dG 和 CytC 的表达与细胞凋亡的关系研究*

刘月影¹,王春红¹,崔盈¹,倪宏²

(1. 江南大学附属医院儿科,江苏无锡 214062;2. 苏州大学附属儿童医院神经病学研究室,江苏苏州 215003)

[摘要] **目的** 探讨新生儿大鼠反复惊厥后 8-羟基-2'-脱氧鸟嘌呤核苷(8-OH-dG)和细胞色素 C(CytC)的表达与细胞凋亡的关系。**方法** 将 24 只日龄 8 d 的大鼠分为惊厥组和对照组,惊厥组进一步分为惊厥后 3 h、24 h、48 h,每组 6 只。采用吸入三氟乙醚诱导新生儿大鼠反复惊厥持续状态模型,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 8-OH-dG 水平,实时荧光定量 PCR(RT-PCR)和原位末端标记法(TUNEL)分别检测海马 CytC 的表达和细胞凋亡。**结果** 与对照组相比,TUNEL 显示惊厥组海马神经元细胞凋亡明显增多($P < 0.01$),呈棕黄色颗粒。血清 8-OH-dG 水平在末次惊厥后各时间点均明显高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与对照组相比,CytC 在末次惊厥后 3 h、24 h 增高($P < 0.01$),48 h 后下降至正常水平。8-OH-dG、CytC 与细胞凋亡呈正相关($r = 0.662, 0.565, P < 0.05$)。**结论** 线粒体损伤可能参与了发育期反复惊厥后脑损伤。

[关键词] 反复惊厥;8-羟基-2'-脱氧鸟嘌呤核苷;细胞色素 C;细胞凋亡;新生大鼠**[中图分类号]** R742.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)35-4908-03

The relationship between the expression of 8-OH-dG, CytC and apoptosis in neonatal rats with recurrent seizures*

Liu Yueying¹, Wang Chunhong¹, Cui Ying¹, Ni Hong²

(1. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214062, China;

2. Neurology Laboratory, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between the expression of 8-OH-dG, CytC and cell apoptosis in neonatal rats with recurrent seizures. **Methods** Totally 24 eight-day-old SD rats were randomly divided into two groups; the recurrent seizures group (RS group, 30 minutes seizure induced by flurothyl once per day for 7 consecutive days) and control group (CON group, rats were treated without flurothyl). At designated time points (CON group, 3, 24, 48 h after the last seizure in RS group), the hippocampus of six rats from each group were rapidly dissected out after blood drawn from heart. The 8-OH-dG was detected by ELISA method. The expression of CytC and apoptosis were detected by RT-PCR and TUNEL method respectively. **Results** Compared with the CON group, TUNEL showed that the apoptotic cell counts in RS group were rapidly increased, especially at 24 h after the last seizures [(54.83 ± 7.16) cells/HPF vs. (15.16 ± 2.48) cells/HPF, $P < 0.01$]. In RS group, the serum levels of 8-OH-dG were significantly higher than that in CON group, particularly at 24 h after the last seizures [(1.263 83 ± 0.221 30) pg/μg vs. (0.822 16 ± 0.039 380) pg/μg, $P < 0.01$]. The expression level of CytC mRNA significantly increased at 3 h after the last seizures (0.114 36 ± 0.005 28 vs. 0.093 01 ± 0.009 79, $P < 0.01$) and at 24 h after the last seizures (0.105 62 ± 0.007 26 vs. 0.093 01 ± 0.009 79, $P < 0.01$), then decreased to normal level. There were obviously positive correlation between 8-OH-dG, CytC and apoptosis ($r = 0.662, 0.565; P < 0.05$). **Conclusion** The levels of 8-OH-dG and CytC were significantly up-regulated and had positive correlation with apoptosis, suggesting that mitochondrial damage might be involved in the brain injury after the recurrent seizures in neonatal rats.

[Key words] recurrent seizures; 8-OH-dG; CytC; cell apoptosis; neonatal rats

线粒体途径是细胞凋亡的重要途径^[1]。当有害物质如活性氧自由基等作用于线粒体,一方面可以使线粒体内膜通透性增高,线粒体肿胀,外膜破裂,线粒体凋亡标志物细胞色素 C (CytC) 释放至胞质,通过激活 Caspase 家族诱发细胞凋亡;另一方面可以通过线粒体 DNA 链断裂、位点突变、双链畸变及 DNA 碱基的氧化损伤等形式造成 DNA 损伤,进一步导致细胞凋亡,8-羟基-2'-脱氧鸟嘌呤核苷(8-OH-dG)作为损伤 DNA 后形成的最常见产物,是 DNA 损伤的重要指标^[2]。线粒体作为细胞内的重要细胞器在癫痫发病中的作用已受到学者的广泛关注^[3]。本研究拟通过建立新生儿大鼠反复惊厥模型,观察反复惊厥发作后 8-OH-dG 和 CytC 的表达及其与细胞凋亡的关系,探讨线粒体损伤在发育期反复惊厥脑损伤中的意义。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 24 只日龄 8 d 的健康 SD 大鼠,体质量

18.23~21.79 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[许可证号 SCXK(沪)2012-0002]。大鼠分为惊厥组和对照组,惊厥组进一步分为惊厥后 3 h、24 h、48 h 亚组,每组 6 只。

1.1.2 主要仪器与试剂 三氟乙醚(Aldrich Chem. Co. PO. Box355,美国)密封避光保存;8-OH-dG 试剂盒(Cayman Chemical Company,美国);TUNEL 试剂盒(Boehringer Mannheim,德国);Trizol(Invitrogen Life Technologies,美国);逆转录酶、核糖核苷酸酶抑制剂(Invitrogen,美国);Light Cycler 2.0 PCR 仪(Roche,德国);RT6000 型酶标仪(雷杜生命科学有限公司,深圳);引物根据 Gene Bank 核酸序列,Premier 3.0 软件设计,上海生工公司合成。Cyt-C:上游引物为 5'-GGT GAT GTT GAA AAA GGC AAG AA-3',下游引物为 5'-TGC TTG CCT CCT TTT TCC A-3';β-actin:上游引物为 5'-GAC AGG ATG CAG AAG GAG ATT ACT-3',下游引物为 5'-TGA TCC ACA TCT GCT GGA AGG T-3'。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81471337);无锡市卫计委科研项目(MS201518)。 作者简介:刘月影(1975-),副主任医师,硕士,主要从事小儿神经系统疾病临床研究。

1.2 方法

1.2.1 新生期大鼠反复惊厥模型的建立 采用三氟乙醚按照田甜等^[4]的方法致反复惊厥,使惊厥持续 30 min;每天诱导 1 次,连续 7 d(惊厥组);对照组除不给予三氟乙醚外其他处理与惊厥组相同。

1.2.2 标本的制备和取材 取对照组和反复惊厥后 3、24、48 h 大鼠各 6 只,10%水合氯醛麻醉后心脏取血,并立即断头,冰上取一侧海马-80 °C 保存备用用于实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 CytC 表达水平;另一半脑组织立即置于 10%的多聚甲醛中固定,用于制作石蜡标本进行苏木精-伊红(HE)、原位末端标记法(TUNEL)染色;取出的血液静置 1 h 后 4 °C 1 800 r/min 离心 10 min,取上清液,分装于 EP 管中,立即置于-80 °C 保存备用,以酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 8-OH-dG 水平。

1.2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡 取 10%多聚甲醛溶液中固定 1 周以上的脑组织,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,切片,脱蜡,TUNEL 法检测细胞凋亡。操作过程按凋亡试剂盒说明书进行,在高倍视野下(×400)选 6 个不同的视野,计算各个视野的阳性细胞数(胞核呈棕黄色颗粒)。

1.2.4 ELISA 法检测血清 8-OH-dG 水平 检测前取出一 80 °C 保存标本,常温解冻,所有标本均为同批测定。各项操作严格按试剂盒说明进行,每份标本重复 3 次,取其均值。结果基于每次 8-OH-dG 标准溶液实验的线形校正曲线计算,所得数据以每微克 DNA 所含的 8-OH-dG 的皮克数(pg/μg)表示。

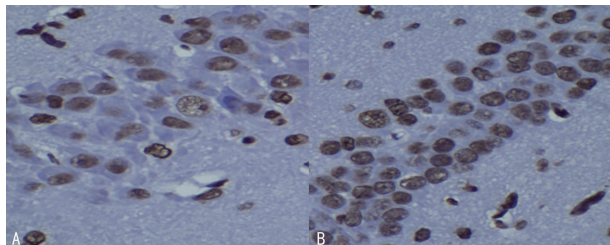
1.2.5 RT-PCR 法检测 CytC mRNA 的表达 参照 Trizol 试剂说明书,提取海马的总 RNA 并逆转录 cDNA。PCR 扩增采用 SYBR Premix ExTaq 探针法。PCR 反应用 β-actin 作为内参,反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 15 s,60 °C 退火延伸 1 min,循环 45 次。绘制扩增曲线,反应结束后得到各反应

管的循环阈值(Ct),将目的基因 CytC 的 Ct 值与内参基因 β-actin 的 Ct 值相减得到校正的目的基因 CytC 的 Ct 值,即 ΔCt,CytC 基因相对表达量以 2^{-ΔCt}表示。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,相关性分析采用 Pearson 相关分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 凋亡细胞 TUNEL 染色及计数结果 海马 CA1 区,对照组少见 TUNEL 阳性细胞,细胞核呈深染棕褐色(图 1A),惊厥组末次惊厥后 3 h 凋亡细胞开始明显表达,高峰表达主要出现于末次惊厥后 24 h(图 1B),末次惊厥后 48 h 可见阳性细胞开始衰减。惊厥组末次惊厥后 3、24、48 h 凋亡细胞数均高于对照组,差异均有统计学意义(均 P<0.01),见表 1。



A: 对照组; B: 惊厥组末次惊厥后 24 h。

图 1 大鼠海马 CA1 区 TUNEL 染色凋亡细胞表达(×400)

2.2 血清 8-OH-dG 水平的动态变化 与对照组相比,惊厥组血清 8-OH-dG 水平在末次惊厥发作后 3、24、48 h 均升高(P<0.05 或 P<0.01);其中末次惊厥后 24 h 增高最明显,见表 1。

2.3 CytC mRNA 表达水平的动态变化 与对照组相比,惊厥组大鼠 CytC 表达在末次惊厥后 3 h 升高,持续至惊厥发作后 24 h(P<0.01),在惊厥发作后 48 h 下降至正常水平,见表 1。

表 1 新生期大鼠反复惊厥后不同时间点细胞凋亡情况及 8-OH-dG、CytC 的表达(n=6, $\bar{x} \pm s$)

指标	对照组	惊厥组		
		3 h	24 h	48 h
凋亡细胞数(个/高倍视野)	15.16 ± 2.48	36.33 ± 5.16 [#]	54.83 ± 7.16 [#]	23.00 ± 1.78 [#]
8-OH-dG(pg/μg)	0.822 16 ± 0.039 38	1.010 01 ± 0.084 92 [*]	1.263 83 ± 0.221 30 [#]	1.030 33 ± 0.118 17 [*]
CytC mRNA(2 ^{-ΔCt})	0.093 01 ± 0.009 79	0.114 36 ± 0.005 28 [#]	0.105 62 ± 0.007 26 [#]	0.094 15 ± 0.007 50

* P<0.05, # P<0.01, 与对照组比较。

2.4 相关性分析 血清 8-OH-dG 水平及 CytC mRNA 表达水平均与凋亡细胞数呈正相关(r 值分别为 0.662、0.565, P 值分别为 0.001、0.003)。

3 讨论

研究表明,细胞凋亡是反复惊厥发作后脑损伤的主要形式^[5]。在细胞凋亡的死亡受体、内质网信号和线粒体信号 3 条途径中,线粒体途径是中枢神经系统疾病较重要的细胞凋亡途径^[6]。

线粒体既是能量代谢和细胞呼吸的重要场所,更是细胞凋亡的中心^[7]。而 CytC 是线粒体电子传递链的重要组成部分,其既参与线粒体能量代谢,当其释放到细胞质中又直接参与细胞凋亡的调节。大量实验研究发现 CytC 从线粒体释放到细胞质是多种细胞凋亡的共同表现,在细胞凋亡过程中起关键作用,敲除 CytC 基因的细胞能对刺激因素诱导的凋亡具有明显的耐受性^[8]。已有研究表明,癫痫发作后 N-甲基-D 天冬氨酸(NMDA)受体激活,钙超载、活性氧等可引起线粒体的通透性转运孔开放,CytC 释放至细胞质^[9]。CytC 与凋亡蛋白活化因子-1(Apaf-1)及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-9 形成 CytC/Apaf-1/Caspase-9 复合物,作用于下游的 Caspase-

3,从而诱发细胞凋亡^[10]。本研究发现,CytC 在反复惊厥发作后海马组织中表达量明显增加,并在 3 h 时呈现明显表达,持续至惊厥发作后 24 h。结合本课题组前期对反复惊厥后 Caspase-3 表达变化在 12 h 出现峰值的研究结果发现^[11],CytC 从线粒体中释放后,可进一步激活下游的 Caspase-3 级联反应诱导细胞凋亡;本研究 TUNEL 法亦显示在惊厥发作后 24 h 海马 CA1 区细胞凋亡达到高峰,CytC 和凋亡细胞数呈正相关,进一步说明 CytC 与细胞凋亡有关。但末次惊厥发作后 48 h CytC 已经回落到正常水平,而细胞凋亡仍有轻度升高,提示 CytC 增高后通过 Caspase-3 级联反应等机制才能诱导细胞凋亡的发生,存在一定的后续效应,进一步支持上述观点。

氧化应激是导致惊厥发作后脑损伤的重要途径,在动物实验及人体内都证实,惊厥发作后氧化应激与惊厥发作后细胞凋亡有关^[12-13]。在机体内存在氧化和抗氧化两大系统,大量的实验证实,在惊厥发作后该系统失衡,氧化系统被激活,抗氧化物酶活性降低,脑防御氧自由基功能受损或降低,机体的总抗氧化能力下降,活性氧产生过多和聚集,进一步诱导细胞凋亡^[14]。DNA 损伤是氧化损伤的重要表现之一^[2],线粒体 DNA 是 DNA 的重要组成部分,在机体内发挥重要功能。当

机体受到外界刺激时, DNA 链上鸟嘌呤 G 被氧化为 8-OH-dG, 可导致基因发生 G→T 突变, 8-OH-dG 的部位还易发生碱基脱落和 DNA 链断裂。因此, 检测 DNA 氧化损伤产物 8-OH-dG 表达, 将为探讨 DNA 氧化损伤与反复惊厥后脑损伤发生的关系提供生物标志^[15]。本实验研究显示, 反复惊厥发作后 8-OH-dG 持续增高至惊厥发作后 48 h, 提示在反复惊厥发作后存在 DNA 损伤。8-OH-dG 与细胞凋亡的相关性分析显示, 二者之间呈正相关, 但 8-OH-dG 先于细胞凋亡下降, 提示 DNA 损伤后可能通过一系列的机制才能进一步导致细胞凋亡的发生, 与 Qiu 等^[16]的研究结果相似。

综上所述, 新生儿反复惊厥后存在细胞凋亡, 线粒体途径在细胞凋亡过程中发挥重要作用。线粒体损伤及可能的修复途径是一个非常复杂的过程, 涉及众多因子的参与, 还待更进一步的深入研究, 从而为治疗发育期惊厥性脑损伤提供新的思路和治疗靶点。

参考文献

- Hiebert JB, Shen Q, Thimmesch AR, et al. Traumatic brain injury and mitochondrial dysfunction[J]. *Am J Med Sci*, 2015, 350(2): 132-138.
- Gürler H, Bilgici B, Akar AK, et al. Increased DNA oxidation(8-OHdG) and protein oxidation(AOPP) by low level electromagnetic field(2.45 GHz) in rat brain and protective effect of garlic[J]. *Int J Radiat Biol*, 2014, 90(10): 892-896.
- Zsurka G, Kunz WS. Mitochondrial dysfunction and seizures; the neuronal energy crisis[J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(9): 956-966.
- 田甜, 孙奇, 赵东敬, 等. 新生儿大鼠反复惊厥后皮质丛生蛋白的表达及生酮饮食的干预作用[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29(9): 694-697.
- Li LY, Li JL, Zhang HM, et al. TGFβ1 treatment reduces hippocampal damage, spontaneous recurrent seizures, and learning memory deficits in pilocarpine-treated rats[J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 50(1): 109-123.
- Streck EL, Gonöalves CL, Furlanetto CB, et al. Mitochondria and the central nervous system: searching for a pathophysiological basis of psychiatric disorders[J]. *Rev Bras Psiquiatr*, 2014, 36(2): 156-167.
- 王佳莹, 张文丽, 元小冬, 等. 线粒体在细胞凋亡中的作用[J]. *中国医学创新*, 2015, 12(6): 143-146.
- Guaragnella N, Passarella S, Marra E, et al. Knock-out of metacaspase and/or cytochrome c results in the activation of a ROS-independent acetic acid-induced programmed cell death pathway in yeast[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(16): 3655-3660.
- Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, et al. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(11): 6161-6166.
- Wang QS, Song F, Zhao X, et al. Expression changes of apoptotic-related proteins in nerve tissues of rats treated with allyl chloride[J]. *Toxicology*, 2007, 231(1): 58-67.
- Ni H, Feng X, Xiao ZJ, et al. Dynamic pattern of gene expression of ZnT-4, caspase-3, LC3, and PRG-3 in rat cerebral cortex following flurothyl-induced recurrent neonatal seizures[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2011, 143(3): 1607-1615.
- Puttachary S, Sharma S, Stark S, et al. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy[J]. *Biomed Res Int*, 2015(2015): 745613.
- Morimoto M, Satomura S, Hashimoto T, et al. Oxidative stress measurement and prediction of epileptic seizure in children and adults with severe motor and intellectual disabilities[J]. *J Clin Med Res*, 2016, 8(6): 437-444.
- Tsai HL, Chang CN, Chang SJ. The effects of pilocarpine-induced status epilepticus on oxidative stress/damage in developing animals[J]. *Brain Dev*, 2010, 32(1): 25-31.
- Ohkawa N, Okumura A, Miyata R, et al. Cerebrospinal fluid oxidative stress marker levels and cytokine concentrations in a neonate with incontinentia pigmenti[J]. *Pediatr Neurol*, 2014, 51(5): 737-740.
- Qiu X, Cao L, Yang X, et al. Role of mitochondrial fission in neuronal injury in pilocarpine-induced epileptic rats[J]. *Neuroscience*, 2013, 245: 157-165.
- (收稿日期: 2016-07-12 修回日期: 2016-10-21)
- (上接第 4907 页)
- growth factor-β/Smad signaling[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(9): 1405-1415.
- Roach KM, Feghali-Bostwick C, Wulff H, et al. Human lung myofibroblast TGFβ1-dependent Smad2/3 signalling is Ca²⁺-dependent and regulated by KCa3.1 K⁺ channels[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2015(8): 5.
- Norton JD, Deed RW, Craggs G, et al. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation[J]. *Trends Cell Biol*, 1998, 8(2): 58-65.
- Kowanetz M, Valcourt U, Bergström R, et al. Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(10): 4241-4254.
- Ruzinova MB, Benezra R. Id proteins in development, cell cycle and cancer[J]. *Trends Cell Biol*, 2003, 13(8): 410-418.
- Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats[J]. *Nat Med*, 1999, 5(2): 226-230.
- Kinoshita K, Iimuro Y, Otagawa K, et al. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats[J]. *Gut*, 2007, 56(5): 706-714.
- 杨婷, 谢汝佳, 罗新华, 等. 丹芍化纤胶囊对肝纤维化大鼠肝脏 Smads 分子表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(9): 1807-1812.
- 赵雪珂, 吴荣敏, 姚玉梅, 等. 丹芍化纤胶囊含药血清对大鼠肝星状细胞 Gremlin 和 BMP7 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(2): 182-186.
- (收稿日期: 2016-05-20 修回日期: 2016-08-08)